



**Facultad de Veterinaria**  
**Universidad Zaragoza**



# **Trabajo de Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**ANÁLISIS DE ENVASE ALIMENTARIO PARA COMPROBAR EL RIESGO DE  
SU INTERACCIÓN CON EL ALIMENTO**

**ANALYSIS OF FOOD PACKAGING TO CHECK THE RISK OF ITS INTERACTION  
WITH THE FOOD**

**Autor:**

JORGE MIGUEL RAMOS LISBONA

**Directoras:**

MARÍA CELIA DOMEÑO RECALDE

PAULA VERA ESTACHO

**Facultad de Veterinaria**

2019/2020

---

# Índice:

1.	<u>Resumen/Abstract</u>	<u>1</u>
2.	<u>Introducción</u>	<u>3</u>
3.	<u>Justificación y Objetivos</u>	<u>11</u>
4.	<u>Metodología</u>	<u>13</u>
5.	<u>Resultados y discusión</u>	<u>20</u>
6.	<u>Conclusiones/Conclusions</u>	<u>29</u>
7.	<u>Valoración personal</u>	<u>31</u>
8.	<u>Bibliografía</u>	<u>32</u>
9.	<u>Anexo I</u>	<u>35</u>
10.	<u>Anexo II</u>	<u>38</u>

## **1. RESUMEN**

En los últimos años, los hidrocarburos de aceites minerales (MOHs) son el foco de un creciente interés tanto para los poderes legislativos como la comunidad científica. La preocupación de los poderes públicos nace a raíz del interés para que se conozcan mejor los efectos perjudiciales que tiene la exposición de MOHs sobre la salud de las personas.

Los MOHs son ampliamente utilizados en todas las industrias y llevan siéndolo desde los inicios de muchas de ellas. Pero es en la industria alimentaria donde más necesario sería su control ya que el envasado es la principal vía de exposición más preocupante. Dentro de los MOHs hay que distinguir dos fracciones, la fracción de hidrocarburos saturados (MOSH) y la de hidrocarburos aromáticos (MOAH). Esta última fracción es la más tóxica de las dos.

El análisis de los MOHs es complejo, separarlos mediante cromatografía es muy difícil y suelen detectarse jorobas de señal que engloban y enmascaran un grupo de compuestos en vez de obtener picos individuales. Por esta razón, es necesario la búsqueda de marcadores que permitan identificar la fuente y la naturaleza de contaminación, y su relación con los MOHs.

El envase alimentario puede estar formado por diferentes materiales siendo los adhesivos una parte importante de estos, ya que su presencia es constante en la estructura de prácticamente cualquier embalaje para formar una estructura multicapa. Aunque el adhesivo no se considera como la principal fuente contaminada con este tipo de sustancias, no hay una evidencia clara de la no presencia de MOHs en el adhesivo para contacto alimentario.

Por tanto el objetivo de este trabajo es la determinación de estos compuestos contaminantes MOHs en lo adhesivos para contacto alimentario. Para ello, inicialmente, se optimizará un método HS-SPME-GC-MS (microextracción en fase sólida por espacio de cabeza - gas cromatografía - espectrometría de masas), que permita analizar una lista de dieciséis posibles marcadores de MOAH, para posteriormente, estudiar su presencia en muestras de adhesivos comerciales utilizados en envase alimentario.

### **ABSTRACT:**

In the last years, mineral oils hydrocarbons (MOHs) are the focus of an increasing interest for the legislative powers as well as the scientific community. Governments are more concerned due to the new insight into the toxicological effects of these compounds on people's health.

MOHs are widely use in all the industries, some of them since the beginnings. But it is the food industry where it would be more necessary to control them because of this worrying exposition pathway.

Inside MOHs, it is necessary to discern between two fractions, the saturated hydrocarbons fraction (MOSH) and the aromatic hydrocarbons one (MOAH). The last of which is the most toxic.

The MOHs analysis is very complex, due to the fact that they cannot be separated properly by chromatography and a humps signal is detected, which engulf and disguise a group of compounds instead of obtaining individual peaks. Because of this reason, it is necessary researching in markers that allow identifying the source and nature of the contamination, and its relationship with MOHs.

Food contact materials can be formed by different kind of materials, being the adhesives used in several multilayer structures. Although the adhesives are not considered as the main source of contamination of these kinds of substances, there is not a clear evidence about the no presence of MOHs in the adhesives used as food contact materials.

Therefore, the project's objective is the determination of MOHS in adhesives used as food contact materials. Firstly, a HS-SPME-GC-MS (head space-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry) method was optimized, which allows determinate a list of sixteen markers of MOAH. After this, the method was used to study the presence of them in commercial adhesives used as food contact materials.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1- ACEITES MINERALES

Los aceites minerales son subproductos líquidos derivados del refinado del petróleo crudo. Son de gran utilidad en las industrias ya que forman parte de la composición de un gran número de productos: cosméticos, lubricantes y aceites para maquinaria, aceites para moldes, agentes activos en plaguicidas, adhesivos, etc. En la industria alimentaria también se encuentran como productos necesarios en gran cantidad de procesos diferentes, principalmente como coadyuvantes. La legislación vigente en la Unión Europea (EU) entiende que estas sustancias son difíciles de reemplazar y, por lo tanto, considera que es imposible impedir por completo la transferencia o migración a los alimentos, pero obliga a su uso responsable, utilizando las cantidades que sean técnicamente necesarias, y trabajando en condiciones óptimas para minimizar la contaminación de los productos alimentarios.

En general se habla de “hidrocarburos minerales” (*“mineral oils hydrocarbons”* o *“MOH”* en inglés) que es un término genérico utilizado para designar mezclas complejas y variadas de distintas moléculas que derivan de aceites minerales.

Según el dossier de Food Packaging Forum (1), los hidrocarburos minerales pueden clasificarse en dos grupos según la forma de la molécula: por un lado los hidrocarburos saturados de aceite mineral (*“Mineral oils saturated hydrocarbons”* o *“MOSH”*) entre los que se encuentran alcanos de cadena abierta y, generalmente ramificada llamados parafinas, y cicloalcanos con uno o más anillos y con sustituyentes alquílicos, denominados naftalenos; y por otro lado los hidrocarburos aromáticos de aceites minerales (*“Mineral oils aromatic hydrocarbons”* o *“MOAH”*) los cuales se caracterizan por ser anillos mono o poli-aromáticos y altamente alquilados. Según Beens (2), el número de compuestos posibles derivados de los aceites minerales sobrepasa fácilmente los cien mil solo para aquellas moléculas de máximo 20 átomos de carbono y el número escala rápidamente conforme se van añadiendo carbonos. Puede que no todos los isómeros se encuentren presente en una muestra, pero la gran mayoría lo estará. El contenido en MOAH generalmente es minoritario, llegando al 35% según la procedencia del petróleo crudo y su proceso de refinado.

La preocupación por los efectos sobre la salud que se podrían derivar de la presencia de estos compuestos en los alimentos no es reciente. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (3) realizó una evaluación toxicológica de los aceites minerales. Aunque la conclusión alcanzada fue que no era necesario establecer una

concentración límite y bastaba con el seguimiento de buenas prácticas de manufacturación. Nuevos hallazgos en los posibles efectos a largo plazo y su comportamiento en el cuerpo humano, además del desarrollo de técnicas analíticas que permiten identificar marcadores y comprender mejor el espectro de moléculas del grupo, han aumentado el interés, por parte de las autoridades así como de la comunidad científica. El foco se centra ahora en vigilar, de forma más concreta, la exposición a los hidrocarburos de aceites minerales y su potencial toxicidad.

## **2.2. CONTAMINACIÓN Y EXPOSICIÓN**

En 2012, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (4) publicó una revisión científica sobre los hidrocarburos de aceites minerales en alimentos. En esta publicación se evaluaron diversos aspectos de este problema a la vez que se establecieron ciertas recomendaciones a cerca de la dirección que deberían tomar la investigación en este tema.

La agencia señala las vías de contaminación para alimentos y piensos, éstas son: los materiales en contacto, los contaminantes ambientales y los aditivos alimentarios. La vía de mayor interés para este trabajo son los materiales de contacto con los alimentos.

Entre los materiales más estudiados, se encuentran el papel y el cartón reciclados. Estos son considerados los materiales más contaminados porque se producen con papel que ya ha sido reciclado antes y al que ha sido incorporado mucha tinta, además de adhesivos, solventes y otros aditivos para su reciclado. Un ejemplo de esta materia prima para producir partes de embalaje alimentario es el papel de periódico.

Las tintas también son importantes, ya que contienen MOHs como disolvente. Estos se volatilizan en el proceso de secado y son liberados a la atmósfera o al interior del envase con el alimento.

Por último, los adhesivos, el tipo de material al que se dedica este estudio, a pesar de no estar muy definida la facilidad con la que estos compuestos pueden migrar desde esta matriz, contienen MOHs que cumplen con distintas funciones.

Según Vera (5), la migración de cualquier contaminante está controlada por 2 mecanismos: la partición y la difusión. La partición es la expresión de la distribución del compuesto migrante entre 2 fases cuando se establece un equilibrio termodinámico. La difusión, por su parte, es un parámetro que expresa la movilidad de las moléculas en una matriz, en este caso se trata del resto de los materiales que envuelven el alimento y el propio alimento.

Estos procesos, en el caso de la migración de compuestos de un adhesivo, se alternan complejamente en etapas (5):

- 1) Difusión del migrante en la matriz polimérica del adhesivo. Este es un proceso de difusión promovida por los movimientos aleatorios naturales de la matriz.
- 2) Establecimiento de un equilibrio químico entre el adhesivo y los sustratos a los que está adherido.
- 3) Difusión del migrante hacia el sustrato al igual que ocurría en el adhesivo.
- 4) Disolución del migrante en la interfase alimento-envase lo que produce un equilibrio químico.
- 5) Dispersión del migrante disuelto en la matriz del alimento.

La EFSA (4) afirma que la toxicidad oral aguda, tanto de MOAH como de MOSH, no es preocupante con los niveles de este tipo de exposición en la población. Sin embargo, de forma crónica, algunos de los MOAH, como el naftaleno, tienen un efecto carcinógeno, como se ha demostrado de forma experimental. Además, se ha demostrado en estudios toxicológicos con animales de experimentación que los MOHS se acumulan en tejidos adiposos como el hígado, incluso pueden producir hipertrofia en los hepatocitos, aunque en ausencia de un efecto patológico no se considera un efecto adverso grave.

En cuanto a la exposición, la agencia estimó que, de media, la población adulta europea ingiere entre 0,03 y 0,007 mg/kg de peso corporal y por día de MOHS. La ingesta es notablemente mayor en niños (de tres a diez años), entre 0,068 y 0,17 mg/kg para el consumidor medio, y de 0,14 a 0,32 mg/kg de peso corporal y por día para los consumidores más expuestos. En cuanto a los alimentos que más contribuyeron a esa exposición variaron, en gran medida, según el rango de edad. Entre los más jóvenes los helados y postres era el grupo de alimentos que más exponía a la población. Entre los adultos, era el pescado. El grupo de alimentos que suponía una fuente de exposición común entre la mayoría de los grupos eran los aceites vegetales (4).

La falta de información fiable sobre la ingesta de MOAH imposibilita la caracterización del riesgo asociado con su exposición por la vía alimentaria según la agencia europea. A pesar de todo, el Panel en Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) dota de mucha importancia su investigación por el efecto carcinogénico de este grupo (4).

### **2.3. LEGISLACIÓN Y CONTROL**

La presencia de estos compuestos en productos alimentarios es vigilada pero tampoco se considera necesario el establecimiento de una concentración límite. A nivel legal, la única acción legislativa que se ha llevado a cabo es la publicación de la Recomendación (EU) 2017/84 de la Comisión, de 16 de enero de 2017 (6), que pone atención sobre diversos grupos de alimentos más susceptibles y los materiales destinados al contacto utilizados con ese tipo de productos.

Una de las causas por las que aún no está establecido un control similar como el que se tiene sobre la presencia de otros contaminantes químicos es la dificultad del análisis como señala el equipo de la BLL (German Federation of Food Law and Food Science) en su “Caja de herramientas para la prevenir la transferencia de hidrocarburos de aceites minerales no deseados en los alimentos”, de 2019 (7).

### **2.4. ADHESIVOS**

Este trabajo centra su atención sobre los MOAHs en los materiales de contacto con los alimentos, en concreto, sobre los adhesivos. Otros componentes del embalaje como las láminas de papel y cartón reciclado son considerados, con diferencia, los materiales más contaminados. Y a pesar de que no suelen tener un contacto directo con el producto, su importancia radica en que su presencia es ubicua en toda la estructura del embalaje. Fácilmente puede producirse un fenómeno de migración desde el adhesivo que permita la aparición de estos compuestos en la comida.

En la actualidad, un adhesivo es una matriz compleja de muy diferentes sustancias que cumplen funciones concretas. Los adhesivos se utilizan para mantener la estructura y la geometría del envoltorio, por ejemplo, en láminas con distinto grado de dureza de múltiples capas de cartón o plástico. También se usan para adherir las etiquetas. En cualquier caso, su función es la de mantener dos superficies juntas de forma fuerte y relativamente duradera.

El hecho de que sean una matriz muy compleja hace puedan fácilmente contener sustancias con tendencia a migrar, a la vez que son muestras difíciles de analizar. Algunos de los componentes básicos con función específica más importantes que forman el adhesivo según Vera (5), son:

- 1) La base adhesiva es el principal componente y también el que realiza la función principal, de adherir el producto a las superficies objetivo.



- 2) El agente curado se añade para producir la polimerización, y acaba formando parte del polímero generado.
- 3) El catalizador también promueve la polimerización pero no acaba formando parte del polímero.
- 4) El acelerador, inhibidor o retardador se añade cuando es necesario controlar la velocidad de curación.
- 5) Los disolventes dispersan los componentes con capacidad adhesiva para obtener un producto más fácil de aplicar, modificando su consistencia y su viscosidad.
- 6) Los rellenos son sustancias no adhesivas que dotan al pegamento de mejoras relacionadas con diversas propiedades de trabajo.

Estos son solo algunos de los principales componentes, pero hay infinidad de ingredientes que pueden utilizarse para dotar a un adhesivo de una nueva cualidad, y potenciar o minimizar una característica.

De la misma forma que los ingredientes de un adhesivo son muy variados, también lo son los propios adhesivos. Según Vera (5) pueden ser clasificados conforme a:

- 1) El origen de sus materiales: en sintéticos, con los que se forman polímeros, y naturales, como sustancias con capacidad adherente provenientes de la yuca.
- 2) Función que desempeñan: estructurales, los cuales han de ser muy resistentes al ambiente y a las cargas; o no estructurales, que generalmente no es necesario que sean muy resistentes.
- 3) Su composición química: termoendurecibles, que se curan mediante una reacción química irreversible que puede requerir calor o no; termoplásticos, los cuales no se curan mediante una reacción química si no fundiéndose con calor y endureciéndose al enfriarse. Estos últimos son los adhesivos objeto de este estudio, también denominados como adhesivos hotmelt.
- 4) El método de aplicación o reacción con el sustrato: por reacción química, con un agente de curado o algún tipo de aporte energético; por pérdida de disolvente o agua, que debe ser forzada para que el producto se mantenga adherido, o por enfriamiento tras la fusión, que generalmente suelen ser los termoplásticos ya explicados.
- 5) La forma física: líquido, pasta o sólido.

## **2.5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ACEITES MINERALES**

Como ya se ha indicado con anterioridad, los hidrocarburos de aceites minerales son mezclas complejas de difícil análisis. Cuantificar individualmente todos los componentes de este grupo

en una muestra es imposible. Los resultados que proporciona una cromatografía de gases no son picos individuales sino una montaña compleja de con señales amplias. Por este motivo, este trabajo trata de encontrar un método que permita detectar y cuantificar marcadores que indiquen la contaminación por MOAHs.

La EFSA (4) recomendó, para el análisis de los MOHs, utilizar cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) online, como etapa de pre-separación, en conjunto con cromatografía de gases (GC) y detector de ionización de llama (HPLC-GC-FID).

Paralelamente, el comité de Normalización Europeo publicó en 2017 (8) el primer método europeo estandarizado para la cuantificación de MOSH y MOAH en aceites vegetales y similares. Pese a la publicación de este método normalizado, de forma oficial, el laboratorio de referencia de la Unión Europea para materiales en contacto con alimentos (LR-UE) aún no ha publicado ningún método oficial, así que el método sigue siendo una recomendación (6).

Esta técnica de análisis, HPLC-GC-FID, es aplicada en la mayoría de trabajos científicos y permite detectar y cuantificar las fracciones de MOHS y MOAH en muestras formando distintas jorobas ("humps" en inglés) que agrupan moléculas con un comportamiento similar.

El principal problema de este método es el alto precio de los equipos que utiliza, ya que pocos laboratorios tienen acceso a instrumentos así por lo que tiene un muy limitado uso para análisis de rutina. Por tanto, la principal alternativa es seleccionar marcadores, moléculas detectables que identifican la presencia de algún grupo de compuestos específico, y utilizar espectrometría de masas con uno o varias etapas de separación por cromatografía gases y usar como detector un espectrómetro de masas (GC-MS). Esta técnica de análisis permite centrarse en un número reducido de compuestos para detectarlos y cuantificarlos aunque estén en concentraciones bajas por su alta sensibilidad. Posteriormente la concentración de los marcadores se relaciona con la presencia de los MOHs o alguna de sus fracciones. En cualquiera de los casos, existe la limitación de que la técnica es específica para un grupo de muestras, ya sea solo aplicable a un grupo de alimentos o solo en adhesivos.

El objetivo de este trabajo es comprobar la validez como marcadores de 16 compuestos (2-metilnaftaleno; 1-metilnaftaleno; bifenilo; 2,6-dimetilnaftaleno; acenafteno; 9,9-dimetilfluoreno; 2,6-diisopropilnaftaleno; 3,3',5,5'-tetrametilbifenilo; 4-metildibenzotiofeno; 4,6-dimetildibenzotiofeno; 3,6-dimetilfenantreno; 1-metilpireno; benzo(b)napto(2,1-d)tiofeno; y criseno) de la familia de los MOAHs en adhesivos. La lista de estos compuestos se basa en las

conclusiones obtenidas previamente por Jaén et al. (9) en su estudio de selección de posibles marcadores de MOAHs.

La separación, en la técnica de análisis de este estudio, se lleva a cabo por cromatografía de gases. Esta consiste en introducir la muestra en forma gas en la cabeza de una columna cromatográfica que separa los compuestos según la interacción de estos con el revestimiento interno de la misma. La muestra es arrastrada por un flujo de un gas inerte, generalmente helio ( $\text{He}_2$ ), que conforma la fase móvil. La columna es un tubo fino y alargado en cuyo interior se encuentra la fase estacionaria. El contacto con la fase estacionaria interacciona con los compuestos de la muestra produciendo la distinta retención de los analitos. La columna además se encuentra situada en un horno programable ya que la interacción de la muestra depende de la temperatura de la misma. Las columnas pueden ser de 2 tipos, columnas empaquetadas en las que la fase estacionaria es un líquido sobre un material sólido que conforma el relleno; o capilares cuya fase estacionaria es un líquido depositado directamente sobre la pared del tubo, o un líquido impregnando un soporte adsorbente.

Seguidamente, la muestra separada por la columna sale a un detector que sirve para poner de manifiesto y cuantificar la sustancia al emitir una señal proporcional a la concentración de los analitos. Para este trabajo, el detector acoplado al equipo es un espectrómetro de masas. Se fundamenta en la ionización de las moléculas que procesa, dividiéndolas en masas menores con las que, posteriormente, genera la señal correspondiente a una proporción entre masa molecular y carga de estas partículas.

Una gran ventaja a la hora de utilizar como detector un espectrómetro de masas es la capacidad de modificar la forma en que se procesan las señales. Es posible utilizar el modo SCAN que hace que el detector procese todas las masas que recibe, lo cual nos da información de todos los compuestos que se encuentran presentes en la muestra, a costa de que el continuo flujo de iones reduzca la sensibilidad del equipo. Este modo es útil para entender el conjunto general de la matriz sujeto de estudio y tratar de identificar compuestos presentes.

Cuando el interés es detectar y cuantificar analitos concretos de la muestra, es posible diseñar un método SIM. Al contrario del modo SCAN, se consigue una sensibilidad ya que el equipo procesa de forma discreta ciertas masas en intervalos de tiempo concretos. Para obtener estas masas, es necesario partir antes de un cromatograma de la muestra o, preferiblemente, de un patrón que se haya analizado en modo SCAN. La masa mayoritaria de un compuesto es su masa de cuantificación y la siguiente con mayor señal, la de confirmación. Para elegir el

intervalo de tiempo basta con escoger un rango de tiempo alrededor del momento en el que aparece el pico correspondiente al compuesto en el patrón.

Por último, una de las partes más importantes que más influye en el análisis es la técnica de inyección. Entre las más habitualmente usadas en cromatografía de gases se encuentran las siguientes:

- 1) Directa: la muestra es vaporizada completamente y se introduce en la columna en su totalidad. Es la más sencilla y sirve para un rango amplio de concentraciones.
- 2) "Split": la muestra es vaporizada completamente pero solo una pequeña porción se introduce en la columna, el resto se descarta. Es la más utilizada por su velocidad, que permite procesar un gran número de muestras pero tiende a discriminar compuestos con puntos de evaporación más altos.
- 3) "Splitless": la muestra es vaporizada completamente y se introduce en la columna en su totalidad, pero la mayor parte entra durante el primer o segundo minuto del análisis. Tiene mayor sensibilidad que la inyección "Split".
- 4) "Head Space" (HS): la muestra se calienta para favorecer que los compuestos volátiles que se quieren analizar pasen al espacio de cabeza de un vial sellado herméticamente. La temperatura y el tiempo que se aplica son variables que de forma óptima deberían permitir que las fases de los compuestos a analizar alcancen un equilibrio. Una vez alcanzado se analiza una alícuota de la atmósfera que se ha formado.
- 5) "HS - Solid Phase Micro Extraction" (HS - SPME): se utiliza una fibra de microextracción en fase sólida SPME capaz de absorber o adsorber compuestos en su matriz, para posteriormente resorberlos en la columna, este sistema es muy útil para analizar compuestos volátiles de muestras en estado sólido, objeto de este estudio

Los adhesivos son muestras sólidas y los marcadores seleccionados son volátiles de mayor o menor peso molecular. El método HS-SPME se basa en la extracción de compuestos volátiles en el espacio de cabeza del vial con una fibra de sílice recubierta de un sorbente que se acopla a una jeringuilla. La extracción está mediada por la temperatura de extracción, que condiciona que unos compuestos u otros se volatilicen; y el tiempo de incubación, que es el tiempo que se deja la fibra trabajar. De forma general, los compuestos más ligeros se extraerán primero y, conforme más tiempo transcurra, compuestos más pesados desplazarán a los primeros. Una vez los analitos han sido extraídos en la fibra, la desorción se produce tras inyectar (10).

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en 2018 (11) consideró que sería interesante el uso de marcadores debido a la gran dificultad para analizar los MOHs de forma individual. Los marcadores son moléculas cuya presencia confirma que un grupo de señales, las cuales en cromatografía de gases se observan con forma de montaña o joroba, y se relacionan con los hidrocarburos de aceites minerales, realmente lo son. El desarrollo de un método que permitan analizar los marcadores seleccionados en adhesivos es una base que podría derivar en una mejor comprensión sobre la migración de los MOHs en esta parte del envoltorio alimentario y ejercer un mayor control legislativo.

Ese es el objetivo general del estudio, optimizar un método analítico (HS SPME-GC-MS) que permita analizar una lista de marcadores de forma eficaz para posteriormente identificar la contaminación de MOAHs en adhesivos termofusibles utilizados en envase alimentario.

La estrategia para conseguir ese objetivo se fundamenta en los siguientes pasos:

- I. Elegir una fibra óptima para la extracción de los compuestos por adsorción y liberación por desorción. Este proceso se ve influenciado por la interacción de la fibra con los propios compuestos, por lo que la elección de una fibra que permita extraer la concentración que más se acerque a la real en la muestra, es esencial para obtener unos resultados precisos.
- II. Optimizar el método de inyección: La temperatura y el tiempo de extracción en un método HS-SPME son variables que influyen en la forma en que los compuestos se volatilizan, pasan al espacio de cabeza y son extraídos por la fibra. Optimizarlos, una vez se ha elegido la fibra que se va a utilizar, permite obtener resultados precisos y reproducibles.
- III. Diseñar un método de cuantificación SIM: Una vez se han analizado los patrones en las condiciones óptimas, se utiliza el programa de lectura de datos del equipo para crear un método que permita cuantificar automáticamente las señales de las masas de cuantificación y de confirmación de cada compuesto en un rango de tiempo estimado. Los resultados se obtienen de forma automática al cuantificar las muestras, pero son revisados de forma manual independientemente.

- IV. Elaborar las rectas de calibrado: Una vez cuantificados los patrones se elaboran gráficas para cada analito, cuyas funciones relacionan la proporción entre la señal emitida a cada concentración de disolución patrón.
- V. Analizar los marcadores en una serie de adhesivos comerciales: Utilizando el método SIM creado anteriormente se cuantifican las muestras descritas de adhesivos sin curar y curados (aplicando temperatura), y se obtienen las concentraciones de cada analito en las muestras interpolando en las funciones de las rectas de calibrado.

#### 4. METODOLOGÍA

El trabajo experimental se desarrolló, en el Departamento de Química Analítica de la Escuela de Ingeniería y Arquitectura (EINA) de la Universidad de Zaragoza.

##### 4.1 REACTIVOS

Los reactivos utilizados son los siguientes:

1. Disoluciones patrón con los 16 compuestos a diferentes concentraciones preparados por pesada a partir de una disolución madre de aproximadamente 100 ppm. Las concentraciones aproximadas de los patrones se muestran en la Tabla 1 y la lista de los 16 compuestos en la Tabla 2.

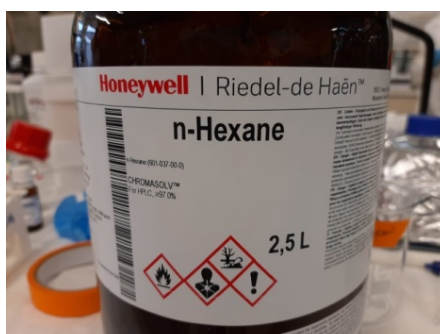
**Tabla 1: Concentraciones aproximadas de los patrones.**

<b>Disoluciones patrón</b>
<b>100ppm</b>
10ppm
7,5ppm
5ppm
2,5ppm
1ppm
0,75ppm
0,5ppm
0,1ppm
0,05ppm
0,01ppm
0,005ppm
0,001ppm

**Tabla 2: Lista de potenciales marcadores.**

	<b>Compuestos</b>		<b>Número CAS</b>
1	2-MN	2-metilnaftaleno	91-57-6
2	1-MN	1-metilnaftaleno	90-12-0
3	BP	Bifenilo	92-52-4
4	2,6-MN	2,6-dimetilnaftaleno	581-42-0
5	ACE	Acenafteno	83-32-9
6	9,9-DMF	9,9-dimetilfluoreno	4569-45-3
7	2,6-DIPN	2,6-diisopropinaftaleno	24157-81-1
8	3,3,5,5-TMB	3,3',5,5'-tetrametilbifenilo	25570-02-9
9	4-MBT	4-metildibenzotiofeno	7372-88-5
10	4,6-DMBT	4,6-dimetildibenzotiofeno	1207-12-1
11	3,6-DMP	3,6-dimetilfenantreno	1576-67-6
12	1-MPYR	1-metilpireno	2381-21-7
13	BZNT	Benzo(b)napto(2,1-d)tiofeno	239-35-0
14	CHRY	Criseno	218-01-9
15	BZFLU	Benzo(d)fluoranteno	205-99-2
16	PER	Perileno	198-55-0

2. n-Hexano de la marca comercial “Honeywell” utilizado como disolvente de los patrones.



**Figura 1: n-Hexano utilizado como disolvente.**

## 4.2. INSTRUMENTACIÓN

El equipo utilizado para el análisis de las muestras es un conjunto de equipos acoplados:

- Un cromatógrafo de gases Agilent 7890A.
- Un automuestreador Combi PAL de la marca comercial CTC Analytics.
- Un espectrómetro de masas como detector, HP 5973 series mass selective detector.



#### 4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA FIBRA

Con el objetivo de estudiar la presencia de los marcadores en adhesivos comerciales, el primer procedimiento experimental es una prueba para elegir la fibra de SPME que permita obtener la mejor señal.

Se parte de una serie de disoluciones patrón con los 16 compuestos considerados marcadores de los hidrocarburos de aceites minerales preparados a partir de una disolución madre de aproximadamente 100 ppm. Las concentraciones exactas han sido calculadas a partir de los valores de esta disolución madre según las tablas recogidas en el Anexo I.

Los adhesivos se mantienen en estado sólido a temperatura. La técnica de inyección que se utiliza es la SPME que nos permite procesar las muestras en estado sólido, sin necesidad de disolverlas o tratarlas de alguna otra forma, y extraer los analitos siempre que estos se puedan volatilizar. Una vez depositada la muestra en el vial, solo es necesario que el equipo la incube cierto tiempo para provocar que los compuestos sujetos de estudio pasen al espacio de cabeza y sean adsorbidos por una fibra de sílice.

Elegir una fibra con afinidad por los compuestos que se tratan de analizar es esencial. Por lo que en el siguiente experimento se inyecta en el cromatógrafo un patrón de 10 ppm utilizando 3 fibras distintas y un mismo método de inyección estándar (temperatura de incubación de 50°C y tiempo de extracción de 15 minutos):

1. Fibra azul CAR/PMDS: Carboxen/polydimethylsiloxano (85µm de espesor): algo apolar y con una capacidad de extracción media. Es una fibra poco selectiva que sirve para analizar muestras con un heterogéneo grupo de compuestos.
2. Fibra gris DVB/CAR/PMDS: Divinilbenceno/Carboxen/polydimethylsiloxano (50/30µm de espesor): más polar y con alta capacidad de extracción. Es una fibra útil para extraer compuestos más bien polares.
3. Fibra roja PMDS Polydimethylsiloxano (100µm de espesor): muy apolar y con gran capacidad de extracción. Muy selectiva y con gran capacidad de separación de compuestos apolares como los marcadores que son sujeto de nuestro estudio.

Todas las fibras son de la marca comercial "Supelco". La Figura 2 es una representación de la relación entre polaridad y capacidad de extracción de las fibras de esta marca comercial.

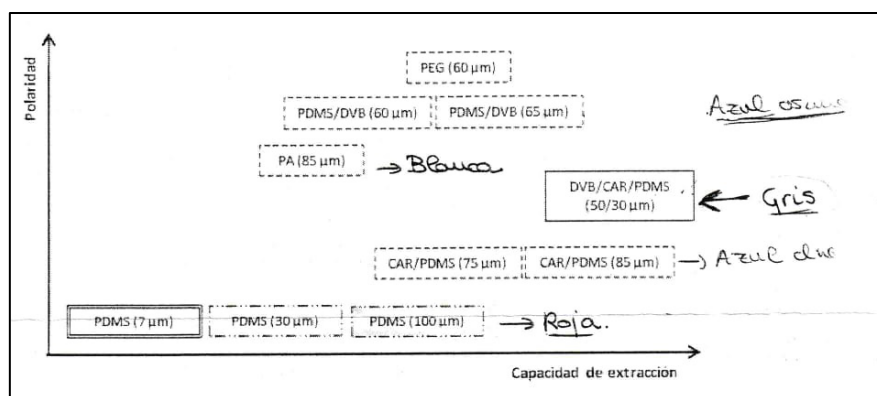


Figura 2: Polaridad/Capacidad de extracción de distintas fibras de la marca "Supelco".

#### 4.4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE INYECCIÓN

Posteriormente se inyectan de forma repetida las disoluciones patrón correspondientes a las concentraciones de 1 ppm; 0,1 ppm; 0,01 ppm; y 0,001 ppm con distintos métodos de inyección, cambiándose las variables de tiempo de inyección y temperatura de incubación según la Tabla 8.

Estos valores son elegidos por un programa que estima el rango de variables en el que es más posible que se encuentren las más óptimas. No se toma el tiempo de desorción como variable y se mantiene en 2 minutos; porque al ser tan corto, reducirlo, no permitiría que se produjera el proceso correctamente, y alargarlo fácilmente provocaría una pérdida de compuestos.

Tabla 8: Posibles variables para la optimización de las condiciones de inyección.

	Temperatura de incubación ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo de extracción (s)
V1	88	1050
V2	31	1050
V3	60	60
V4	40	1800
V5	60	1050
V5	60	1050
V6	40	300
V7	80	1800
V8	60	2111
V5	60	1050
V9	80	300
V5	60	1050
V5	60	1050

Los resultados son procesados por el programa que mediante el tratamiento estadístico, se obtienen las condiciones óptimas.

#### 4.5. DISEÑO DEL MÉTODO DE CUÁNTIFICACIÓN

Previamente se ha trabajado utilizando el detector, el espectrómetro de masas, en modo SCAN; en este modo el equipo recoge información sobre todas las masas de toda la muestra. Es útil para observar los resultados obtenidos cambiando variables, por ello se ha utilizado en los experimentos anteriores. Una vez que el objetivo se convierte en detectar y cuantificar analitos concretos es mejor utilizar un modo SIM. Con un método SIM, el equipo selecciona solo una o dos masas en intervalos de tiempos en los que se esperan las masas de los compuestos pertinentes, aumentando mucho la sensibilidad.

El método se elabora a partir del cromatograma de una disolución patrón de 0,5 ppm; introduciendo en la memoria del programa del equipo para cada compuesto de la lista: el área del pico que corresponde al compuesto, la masa mayoritaria corresponde con la masa de cuantificación, la segunda masa más abundante corresponde con la masa de confirmación y el intervalo de tiempo en el que el equipo va a procesar estas masas porque se estima que es entonces cuando un compuesto concreto va a ser retenido.

Con la fibra roja seleccionada, los patrones preparados, las variables de inyección establecidas y el método de cuantificación generado se procede a inyectar todos los patrones con los que se van a establecer los límites de detección y cuantificación y se van a generar las rectas de calibrado para cada uno de los compuestos.

#### 4.6. CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación se calculan con la fórmula:

$$LD = \frac{3 \times hr \times C1}{hm - hb} \text{ y } LC = \frac{10 \times hr \times C1}{hm - hb}$$

en las que:

- “hr” es la altura del ruido.
- “C1” es la menor concentración en la que la altura del pico del compuesto es al menos 3 veces mayor a la del ruido.
- “hm” es la altura del pico correspondiente al compuesto.
- “hb” es la altura del blanco en el tiempo que aparece el pico.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9: Cálculo de límites de detección y límites de cuantificación.**

Compuesto	Tiempo en 500ppb	C1 (ppb)	hm	hr	hb	LD (ppm)	LC (ppm)
1 2-MN	10,08	750	1500	200	370	0,398	1,327
2 1-MN	10,26	500	1800	300	305	0,301	1,003
3 BP	11,22	500	920	200	440	0,625	2,083
4 2,6-MN	11,55	500	1000	200	350	0,462	1,538
5 ACE	12,53	100	1320	240	300	0,071	0,235
6 9,9-DMF	13,68	5	1200	200	460	0,004	0,014
7 2,6-DIPN	15,31	5	3500	250	2650	0,004	0,015
8 3,3,5,5-TMB	15,97	1	3900	230	2300	0,000	0,001
9 4-MBT	16,8	50	860	200	410	0,067	0,222
10 4,6-DMBT	17,78	5	920	220	395	0,006	0,021
11 3,6-DMP	18,31	5	1600	240	690	0,004	0,013
12 1-MPYR	20,74	100	1500	170	320	0,043	0,144
13 BZNT	21,69	750	3350	200	255	0,145	0,485
14 CHRY	22,36	5000	3130	530	250	2,760	9,201

#### 4.7. RECTAS DE CALIBRADO

Para la recta de calibrado se toman las áreas de los compuestos en los patrones de 0,1 ppm; 0,5 ppm; 0,75ppm; 1 ppm; 2,5 ppm; 5 ppm; 7,5 ppm y 10 ppm; y se relacionan con la concentración real de cada compuesto. Se obtiene una función con la que interpolar la señal obtenida en las muestras para conocer su concentración. El Anexo II recoge las funciones y sus representaciones gráficas.

#### 4.8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Por último, se analizan las muestras, estas se corresponden con adhesivos comerciales termofusibles o también llamados “hotmelt”, utilizados comúnmente en la industria alimentaria.

Para realizar los análisis, se preparan tres réplicas adjudicando un código identificador que consiste en una abreviatura correspondiente al nombre del adhesivo y un número del 1 al 3.

1. Sintemelt E94 (SIN)
2. HPS-mc03-V1 (HPS1)
3. HPS-mc03-V1 (lote: 2014M128-001) (HPS2)
4. PA-461 (PA1) (lote: DB-18122)
5. PA-461 (PA2) (lote: DB-18122)
6. Ivymelt 9273 (IVY)
7. Gureola (GUR)
8. SAMTACK 4 (SAM) (lote: R/17810)

9. WESTREZ 5101P (WES) (lote: HD2309RA06)

Cada una de las réplicas se trocea, con mayor o menor dificultad, y se introduce en un vial tarado hasta llenar aproximadamente un tercio del volumen. Tarar y pesar el vial con la muestra sirve para comprobar que se ha introducido aproximadamente la misma cantidad entre las tres réplicas.

Como se ha mencionado anteriormente, se estudiaron los adhesivos sin curar. Los viales preparados para inyectar se muestran en la Figura 16.



**Figura 16: Viales con muestras de adhesivos troceadas.**

Y también se estudiaron los adhesivos curados, únicamente calentándolos a 140°C en un horno durante aproximadamente 15 minutos, tras enfriarse, se colocaban en la bandeja para ser analizados con la misma metodología (Figura 17).



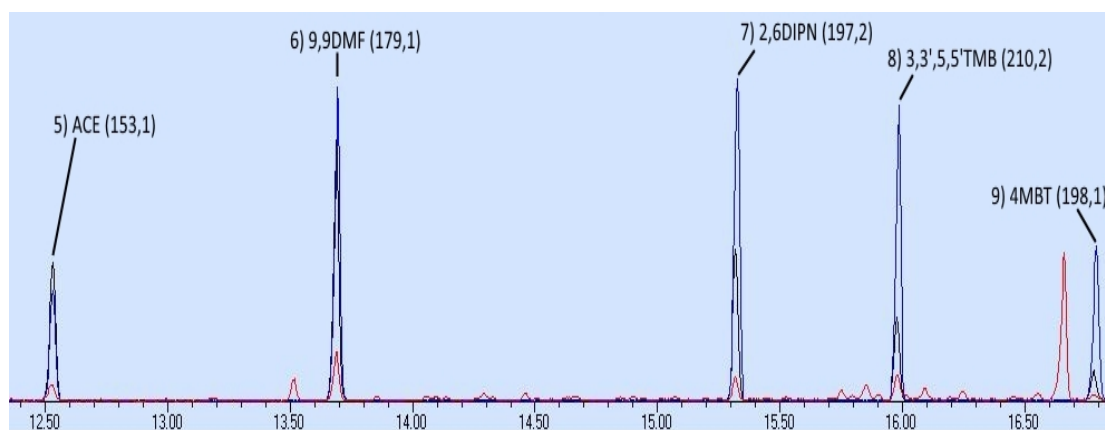
**Figura 17: Viales con muestras de adhesivos**

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO HS SPME-GC-MS

En la primera mitad de la optimización de la condiciones de análisis, se analizó un patrón de 10 ppm de los marcadores a una temperatura de inyección de 50°C y un tiempo de incubación de 15 minutos con tres posibles fibras de SPME.

La Figura 18 muestra las señales emitidas por algunos de los compuestos con distintas condiciones de ensayo. La sensibilidad en los 2 primeros compuestos es bastante parecida entre la fibra roja y la gris, pero en el resto de los casos puede observarse como la fibra roja es mucho más sensible. La fibra azul por otro lado es muy poco selectiva y genera incertidumbre. Por lo tanto, se cumple lo esperado, ya que la mayoría de estos compuestos son principalmente apolares



**Figura 18: Comparación de los cromatogramas del patrón 10ppm analizado con las tres fibras seleccionadas. Condiciones: fibra gris T50°C y 15 min con trazo negro, fibra roja T50 y 15 min en azul y fibra azul T50 y 15 min en rojo.**

Se seleccionó la fibra roja entre la azul y la gris por su gran afinidad por compuestos apolares y alta capacidad de extracción de los compuestos volátiles ligeros como los más pesados.

Además se toma nota del tiempo de retención de los compuestos como guía a la hora de identificarlos en las muestras y de crear el método SIM. Véase Tabla 10,

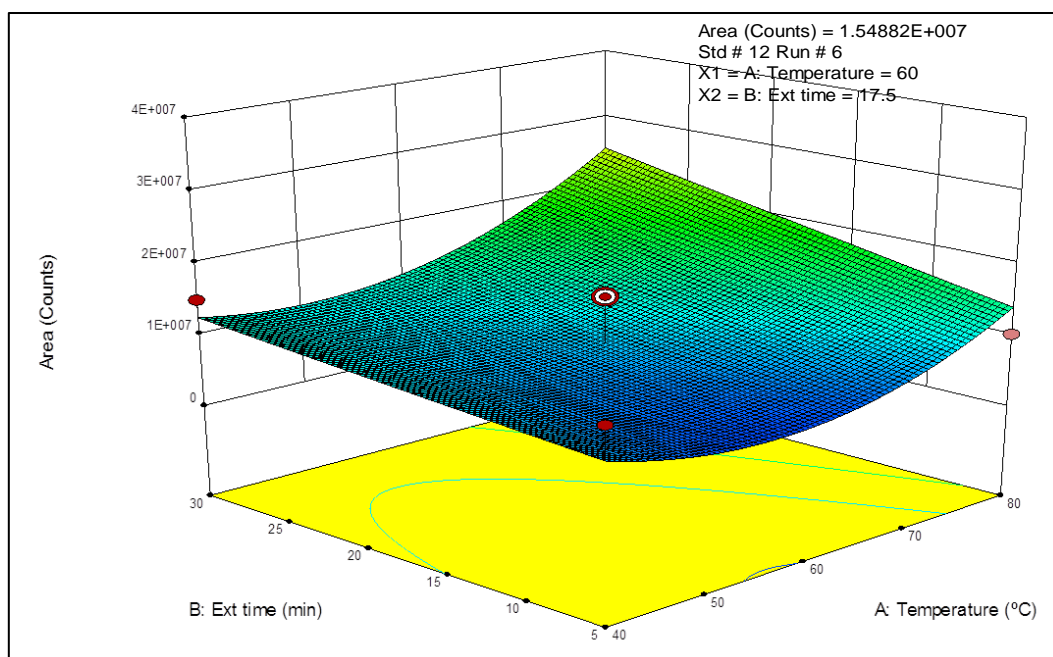
**Tabla 10: Tiempo de retención de los marcadores en patrón 0,5 ppm.**

<b>Compuesto</b>			<b>Tiempo de retención (min)</b>
1	2-MN	2-metilnaftaleno	10,08
2	1-MN	1-metilnaftaleno	10,26
3	BP	Bifenilo	11,22
4	2,6-MN	2,6-dimetilnaftaleno	11,55
5	ACE	Acenafteno	12,53
6	9,9-DMF	9,9-dimetilfluoreno	13,68
7	2,6-DIPN	2,6-diisopropinaftaleno	15,31
8	3,3,5,5-TMB	3,3',5,5'-tetrametilbifenilo	15,97
9	4-MBT	4-metildibenzotiofeno	16,8
10	4,6-DMBT	4,6-dimetildibenzotiofeno	17,78
11	3,6-DMP	3,6-dimetilfenantreno	18,31
12	1-MPYR	1-metilpireno	20,74
13	BZNT	Benzo(b)napto(2,1-d)tiofeno	21,69
14	CHRY	Criseno	22,36

En la segunda mitad, se introdujeron los datos obtenidos del análisis de varios patrones con la fibra roja en un programa estadístico. El programa seleccionó un rango de las posibles condiciones de inyección entre las que podría estar la óptima. Se analizó un patrón en las nueve posibles condiciones.

Se integran las áreas de las señales emitidas por cada uno de los patrones y se introducen estos valores en el programa estadístico. La Figura 19 muestra una representación gráfica de esta comparación. Las líneas representadas sobre el plano amarillo corresponden a las variables seleccionadas y los puntos de la figura en relieve, son la predicción hecha por el programa. El punto con el marcador rojo y blanco es considerado el más óptimo y corresponde con una temperatura de incubación de 60°C y un tiempo de extracción de 1050 segundos.

Estos resultados muestran como la precisión aumenta conforme aumenta la temperatura de incubación donde los compuestos volátiles más pesados empiezan a desplazar a los ligeros y, alcanzan su óptimo, correspondiente a un tiempo de extracción, a los 1050 segundos, que equivalen a 17,5 minutos.



**Figura 19: Gráfico 3D sobre condiciones óptimas de inyección.**

Es remarcable que los 2 últimos compuestos de la lista, el benzo(d)fluoranteno y el perileno, no emiten una señal aceptable en las condiciones que permiten obtener resultados con mayor precisión del resto de compuestos; por este motivo, no se tienen se omiten a partir de este momento en el resto del trabajo.

## 5.2. RESULTADOS ADHESIVOS NO CURADOS

Las señales de cada compuesto obtenidas en el análisis de las muestras de adhesivos comerciales sin curar se interpolaron con las ecuaciones de la recta obtenidas en las rectas de calibrado, recogidas en el anexo I. Estas ecuaciones fueron obtenidas según lo expuesto en el apartado de metodología con rectas de calibrado elaboradas con patrones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

Los datos muestran una distribución bastante homogénea de resultados entre las muestras.

Siete de los compuestos: acenafteno; 9,9-dimetilfluoreno; 2,6-diisopropinaftaleno; 3,3',5,5'-tetrametilbifenilo; 3,6-dimetilfenantreno; 1-metilpireno; benzo(b)napto(2,1-d)tiofeno fueron cuantificables en todas las muestras. Tres: 2-metilnaftaleno; 1-metilnaftaleno; y 4,6-dimetildibenzotiofeno se detectaron en todos los adhesivos. Tan solo dos compuestos, 4-metildibenzotiofeno y criseno, no se encontraron en concentraciones mayores al límite de detección en ninguna muestra.

En cuanto al bifenilo, todas las muestras se encuentran por debajo del límite de detección a excepción de las dos réplicas del adhesivo "Samtack 4". Este adhesivo contiene una



concentración notablemente más elevada en este compuesto que en el resto; pero no sólo eso, es notablemente más elevada que la cualquiera de los compuestos en cualquiera de las muestras. Por último, el 2,6-dimetilnaftaleno también se mantiene por debajo del límite de detección en todas las muestras salvo en ambas réplicas de los adhesivos HPS1 y HPS2. En estas muestras es detectable pero no cuantificable.

Tabla 11: Concentración en ppm de los marcadores en las muestras de adhesivos no curadas.

Concentración (ppb)																		
Compuestos	GUR R1	GUR R2	HPS1 R1	HPS1 R2	HPS2 R1	HPS2 R2	PA2 R1	PA2 R2	PA1 R1	PA1 R2	SAM R1	SAM R2	SIN R1	SIN R2	WES R1	WES R2	IVY R1	IVY R2
2-MN	0,445	0,453	0,446	0,439	0,441	0,449	0,522	0,522	0,523	0,521	0,485	0,506	0,476	0,480	0,490	0,460	<b>0,699</b>	<b>0,739</b>
1-MN	0,334	0,345	0,325	0,327	0,327	0,331	0,376	0,379	0,385	0,373	0,345	0,349	0,337	0,350	0,354	0,337	0,332	0,345
BP	0,207	0,217	0,232	0,228	0,233	0,225	0,207	0,209	0,202	0,205	<b>3,660</b>	<b>4,814</b>	0,230	0,230	0,203	0,205	0,249	0,292
2,6-MN	0,383	0,378	<b>0,556</b>	<b>0,565</b>	<b>0,539</b>	<b>0,538</b>	0,379	0,384	0,379	0,378	0,380	0,385	0,382	0,381	0,388	0,390	0,382	0,384
ACE	<b>2,537</b>	<b>2,901</b>	0,278	0,279	0,280	0,280	0,283	0,285	0,286	0,286	<b>1,253</b>	<b>1,485</b>	<b>0,298</b>	<b>0,306</b>	0,277	0,276	0,277	0,278
9,9-DMF	0,061	0,060	0,060	0,060	0,061	0,060	0,062	0,061	0,062	0,061	0,067	0,068	0,060	0,060	0,060	0,061	0,061	0,062
2,6-DIPN	0,337	0,339	0,333	0,333	0,334	0,333	0,332	0,332	0,332	0,332	0,338	0,337	0,337	0,340	0,339	0,338	0,342	0,346
3,3,5,5-TMB	0,105	0,106	0,107	0,108	0,105	0,105	0,106	0,106	0,106	0,106	<b>0,350</b>	<b>0,418</b>	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105
4-MBT	0,045	0,045	0,044	0,044	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,053	0,056	0,053	0,057	0,047	0,047	0,050	0,050
4,6-DMBT	0,010	0,011	0,009	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,009	0,010	0,012	0,011	0,012	0,014	0,012	0,011	0,012	0,013
3,6-DMP	0,134	0,136	0,131	0,131	0,133	0,132	0,132	0,132	0,132	0,133	0,131	0,132	0,141	0,155	0,132	0,134	0,133	0,133
1-MPYR	0,382	0,377	0,372	0,372	0,372	0,372	0,372	0,372	0,372	0,372	0,373	0,373	0,372	0,373	0,373	0,373	<b>0,408</b>	<b>0,429</b>
BZNT	0,493	0,491	0,490	0,489	0,491	0,491	0,490	0,491	0,491	0,490	0,490	0,491	0,490	0,494	0,494	0,491	0,490	0,491
CHRY	0,203	0,180	0,183	0,178	0,177	0,185	0,181	0,183	0,188	0,182	0,179	0,178	0,177	0,184	0,183	0,182	0,196	0,230
<div> <div>Por debajo de LD</div> <div>Por debajo de LC</div> <div>Por encima de LC</div> </div>																		

### 5.3. RESULTADOS ADHESIVOS CURADOS

La Tabla 12 refleja los resultados obtenidos para los adhesivos tras el proceso de curado.

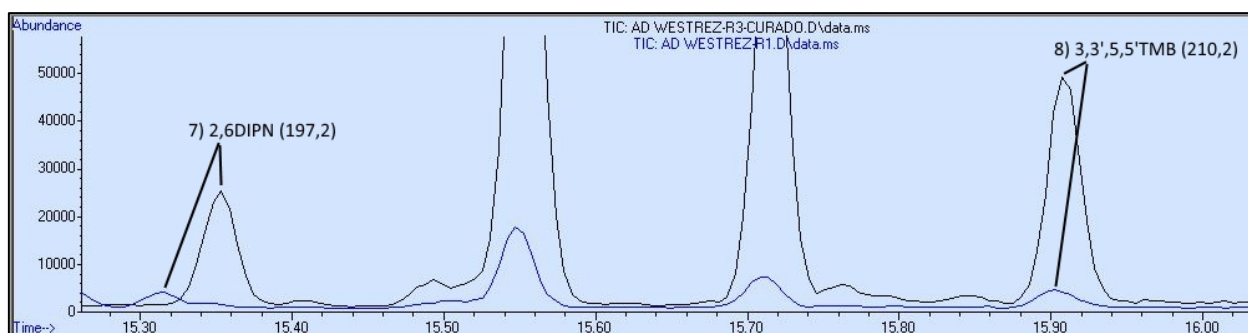
De forma general, los resultados se mantienen de forma parecida respecto a si son detectables y cuantificables o no, pero con alguna excepción. Las concentraciones de 2,6-dimetilnaftaleno en las réplicas de HPS1 y HPS2 no solo son detectables, también son cuantificables tras la curación. Y también es remarcable que la concentración de 4,6-dimetildibenzotiofeno se mantiene por debajo del límite de cuantificación en todas las muestras menos en la réplica del adhesivo “Wetrez”, cuya concentración es más del doble cuando el adhesivo se ha curado.

**Tabla 12: Concentración en ppm de los marcadores en las muestras de adhesivos curadas.**

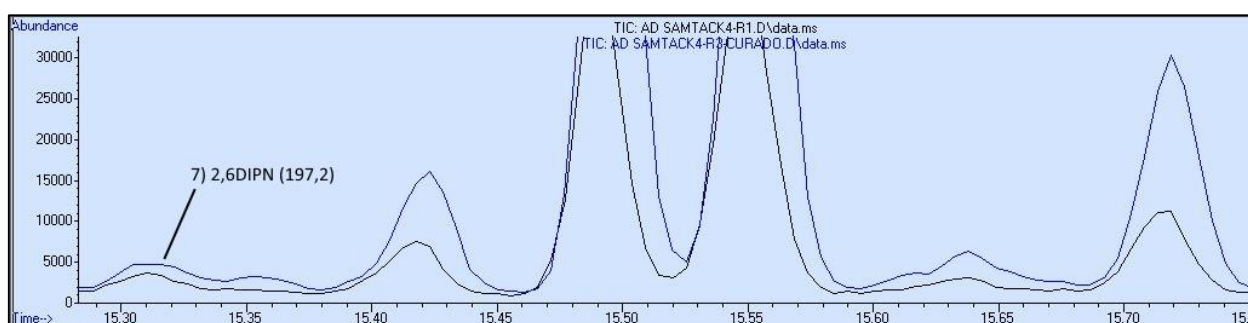
Concentración (ppm)									
Compuestos	GUR R3	HPS1 R3	HPS2 R3	PA2 R3	PA1 R3	SAM R3	SIN R3	WES R3	IVY R3
2-MN	0,460	0,458	0,454	0,562	0,525	0,554	0,483	0,452	0,463
1-MN	0,346	0,334	0,337	0,408	0,375	0,380	0,349	0,365	0,353
BP	0,220	0,261	0,276	0,226	0,229	7,700	0,252	0,202	0,259
2,6-MN	0,387	0,726	0,673	0,382	0,378	0,430	0,379	0,385	0,384
ACE	3,338	0,282	0,286	0,283	0,285	2,055	0,333	0,517	0,393
9,9-DMF	0,063	0,060	0,063	0,062	0,061	0,082	0,061	0,124	0,063
2,6-DIPN	0,341	0,334	0,335	0,332	0,332	0,338	0,338	0,348	0,348
3,3,5,5-TMB	0,107	0,110	0,106	0,106	0,105	0,813	0,105	0,106	0,107
4-MBT	0,048	0,045	0,045	0,045	0,045	0,061	0,056	0,061	0,052
4,6-DMBT	0,013	0,010	0,010	0,009	0,009	0,016	0,014	0,025	0,012
3,6-DMP	0,149	0,131	0,133	0,132	0,131	0,132	0,155	0,151	0,133
1-MPYR	0,385	0,372	0,372	0,372	0,372	0,388	0,372	0,375	0,506
BZNT	0,503	0,491	0,490	0,490	0,491	0,492	0,492	0,491	0,490
CHRY	0,200	0,191	0,185	0,182	0,176	0,187	0,191	0,180	0,215

### 5.4. COMPARACIÓN ADHESIVOS NO CURADOS Y CURADOS

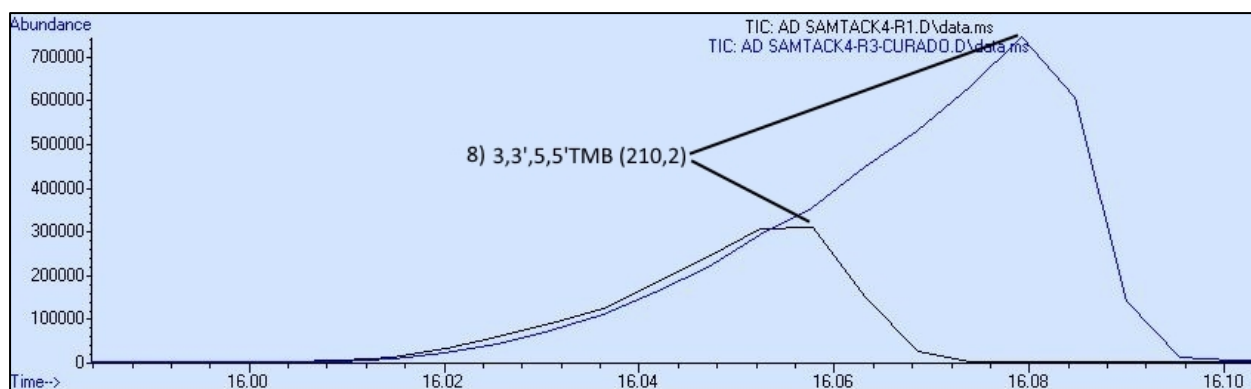
Para comparar los resultados, un simple vistazo a los cromatogramas de las Figuras 20, 21 y 22 permite observar que la curación aumenta la concentración de compuestos en la muestra de forma generalizada. Puede suponerse que a los marcadores les sucede lo mismo. También es fácilmente observable que la réplica curada tiene mayor señal, incluso en picos que no corresponden con ningún marcador. La diferencia en el tiempo de retención está fuertemente ligada con la concentración del analito en la muestra.



**Figura 20:** Superposición de los cromatogramas de la réplica curada (R3), en trazo negro, y no curada (R1), en trazo azul, del adhesivo WESTREZ 5101P.



**Figura 21:** Superposición de los cromatogramas de la réplica curada (R3), en trazo azul, y no curada (R1), en trazo negro, del adhesivo SAMTACK 4. Intervalo de tiempo entre 15,28 y 17,75 minutos.



**Figura 22:** Superposición de los cromatogramas de la réplica curada (R3), en trazo azul, y no curada (R1), en trazo negro, del adhesivo SAMTACK 4. Intervalo de tiempo entre 15,98 y 16,10 minutos.

Con el objetivo de conocer cómo se comportan las concentraciones de los marcadores químicos es necesario compararlos matemáticamente. Primero, se calcula la media aritmética de las 2 réplicas de las muestras no curadas (Tabla 13).

**Tabla 13: Media aritmética de las concentraciones en ppm de los marcadores en las réplicas de adhesivos no curadas.**

	Media aritmética réplicas no curadas (ppm)								
<b>Compuestos</b>	GUR	HPS1	HPS2	PA2	PA1	SAM	SIN	WES	IVY
<b>2-MN</b>	0,449	0,443	0,445	0,522	0,522	0,496	0,478	0,475	0,719
<b>1-MN</b>	0,339	0,326	0,329	0,378	0,379	0,347	0,344	0,346	0,338
<b>BP</b>	0,212	0,230	0,229	0,208	0,204	4,237	0,230	0,204	0,271
<b>2,6-MN</b>	0,381	0,561	0,538	0,382	0,378	0,383	0,382	0,389	0,383
<b>ACE</b>	2,719	0,279	0,280	0,284	0,286	1,369	0,302	0,277	0,278
<b>9,9-DMF</b>	0,060	0,060	0,061	0,062	0,061	0,068	0,060	0,060	0,061
<b>2,6-DIPN</b>	0,338	0,333	0,334	0,332	0,332	0,337	0,338	0,339	0,344
<b>3,3,5,5-TMB</b>	0,105	0,107	0,105	0,106	0,106	0,384	0,105	0,105	0,105
<b>4-MBT</b>	0,045	0,044	0,045	0,045	0,045	0,054	0,055	0,047	0,050
<b>4,6-DMBT</b>	0,011	0,009	0,010	0,010	0,010	0,011	0,013	0,012	0,012
<b>3,6-DMP</b>	0,135	0,131	0,133	0,132	0,132	0,132	0,148	0,133	0,133
<b>1-MPYR</b>	0,380	0,372	0,372	0,372	0,372	0,373	0,373	0,373	0,418
<b>BZNT</b>	0,492	0,490	0,491	0,490	0,490	0,490	0,492	0,492	0,490
<b>CHRY</b>	0,191	0,181	0,181	0,182	0,185	0,178	0,181	0,182	0,213

Una vez obtenida la media, se calcula, en porcentaje, el incremento o decrecimiento de los valores atribuibles al proceso de curación. Se tienen en cuenta solo los compuestos cuya concentración se ha encontrado por encima del límite de cuantificación. Los resultados se expresan en la Tabla 14.

Se adjudica un color a cada rango de incremento para la mejor visualización de los datos. Con los rangos se tratan de expresar la significancia de la variación. La elección de estos rangos es arbitraria. Se consideran poco significativos aquellos incrementos o decrementos menores del 1%, ligeramente significativos entre el 1% y el 10%, significativos entre el 10% y el 50%, y muy significativos aquellos mayores del 50%.

Observando los resultados, el proceso de curación no implica un cambio significativo y generalizado en la concentración de los analitos objetivos. La mayoría de compuestos no varían su concentración de forma significativa en este proceso. Muestras como la del lote DB-18122 del PA-461 (PA1) no variaron la concentración de los marcadores en más del 0,95%. Sin embargo, en aquellos casos en los que la variación se considera al menos ligeramente significativa, la concentración siempre se ve incrementada.

Aun así, la variación de un marcador concreto no aumenta de forma homogénea en todas las muestras. Es decir, la curación favorece un aumento de la concentración de algunos marcadores, pero solo en algunos adhesivos. Parece que los efectos de la curación están muy estrechamente relacionados con los ingredientes y el proceso de fabricación del adhesivo. Lo

que parece no tener tanta relación es el compuesto, ya que todas las muestras se sometieron al mismo proceso y contenían, en general, concentraciones similares de los marcadores.

La única excepción de esta norma podría ser el acenafteno, cuya concentración cambia de forma significativa en cinco de nueve adhesivos. A pesar de ello, la concentración aumenta de forma muy distinta, desde un 10,21% mayor en el SINTEMELT E94, hasta un 87,08% más en el WESTREZ 5010P.

El adhesivo en el que el incremento ha sido más significativo con diferencia es el SAMTACK 4, además en compuestos cuya concentración ya era notablemente más alta en comparación con el resto de muestras: bifenilo; acenafteno; y 3,3',5,5'-tetrametilbifenilo.

Otros adhesivos en los que el incremento es significativo son el WESTREZ 5101P, el Ivymelt 9273, el Gureola y el SINTEMELT E94. En algunos casos un incremento significativo en la concentración de algunos compuestos sigue relacionándose con una concentración de partida por encima del resto de las muestras.

El WESTREZ no muestra este comportamiento a pesar de tener los mayores aumentos de este grupo. En los tres restantes, el acenafteno aumenta de forma significativa tras la curación, y todos poseen concentraciones superiores a la media en este analito en concreto. Por último, este fenómeno también le ocurre al Ivymelt 9273 con el 1-metilpireno.

Puede que estos compuestos provengan de ingredientes con funcionalidad específica, que no se incluyan en todos los adhesivos y, además, intervengan en el proceso de curación. De ser así, este tipo de ingredientes serían una fuente de contaminación importante de MOHs en adhesivos de tipo “hot melt”.

**Tabla 14: Incremento en porcentaje de la concentración de los marcadores tras el proceso de curado.**

Incremento (%) de la concentración tras la curación										
Compuestos	GUR	HPS1	HPS2	PA2	PA1	SAM	SIN	WES	IVY	
3 BP	-	-	-	-	-	81,75	-	-	-	
5 ACE	22,74	1,30	2,10	-0,34	-0,16	50,10	10,21	87,08	41,37	
6 9,9-DMF	4,32	0,62	3,50	1,25	-0,17	21,96	1,58	105,47	2,62	
7 2,6-DIPN	0,92	0,20	0,51	-0,07	0,01	0,31	0,06	2,83	1,08	
8 3,3,5,5-TM	1,76	2,56	0,30	0,42	-0,82	111,66	0,16	0,43	1,29	
11 3,6-DMP	10,24	0,00	0,12	-0,18	-0,95	0,38	4,43	13,10	0,15	
12 1-MPYR	1,29	0,07	-0,10	-0,15	-0,04	3,95	-0,18	0,61	21,00	
13 BZNT	2,21	0,22	-0,25	-0,03	0,15	0,29	-0,03	-0,39	0,01	
Variación en valor absoluto										
<div> <div>x &lt; 1%</div> <div>1% ≤ x &lt; 10%</div> <div>10% ≤ x &lt; 50%</div> <div>50% ≤ x</div> </div>										

## 6. CONCLUSIONES

- I. Se optimizó un método HS SPME-GC-MS para catorce compuestos potenciales marcadores de MOAH utilizando disoluciones patrón de cada uno de ellos.
- II. Se analizaron nueve muestras de adhesivos comerciales “*hot melt*” para comprobar la validez de los catorce marcadores y del método. Siete de los compuestos se encontraron por encima de sus límites de cuantificación, y tres, por encima de sus límites de detección en todas las muestras. Estos siete compuestos (acenafteno; 9,9-dimetilfluoreno; 2,6-diisopropinaftaleno; 3,3',5,5'-tetrametilbifenilo; 3,6-dimetilfenantreno; 1-metilpireno; benzo(b)napto(2,1-d)tiofeno) se pueden utilizar como marcadores que identifican la contaminación por MOAHs en adhesivos.
- III. Se analizaron los catorce posibles marcadores con el método optimizado en réplicas curadas y sin curar de los mismos adhesivos con el objetivo de comparar los resultados. Los datos indican que la curación aumenta la concentración de solo algunos compuestos y en algunas muestras. Esto sugiere que los ingredientes y el proceso de fabricación influyen en gran medida sobre qué compuestos aumentan su concentración y cuáles no, durante la curación.
- IV. Al comparar las muestras curadas y las no curadas, surgió la dificultad de tener que considerar un incremento de concentración más significativo que otro solo por ser mayor. Fue imposible tener en cuenta la concentración de partida y otros aspectos, como la toxicidad del compuesto o su relación con fracciones de los MOAHs específicas con efectos perjudiciales sobre la salud concretos.  
  
Sería interesante realizar un estudio multidisciplinar que permitiera relacionar los marcadores y la toxicidad de las fracciones de MOAH que pudieran identificar, con la concentración de estos en adhesivos curados y sin curar. Para poder establecer de forma adecuada la influencia que tiene la curación sobre la peligrosidad de cada adhesivo.

## CONCLUSIONS:

- I. A HS SPME-GC-MS method has been optimized for fourteen potential markers of MOAH using standard solutions.
- II. Nine samples of commercial adhesives “hot melt” were analyzed in order to check the fourteen markers and the method of analysis validity. Seven of the compounds were found above their quantification limits, and three, were above their detection limits in all the samples. These seven compounds (acenaphthene; 9,9-dimethylfluorene; 2,6-diisopropylnaphthalene; 3,3',5,5'-tetramethylbiphenyl; 3,6-dimethylphenanthrene; 1-methylpyrene; benzo(b)naphto(2,1-d)thiophene) can be used as markers that identify MOAH presence in adhesives.
- III. The potential fourteen markers were analyzed with the optimized method in cured and uncured adhesives with the objective of comparing the results. The data show that curation increases the concentration of some compounds but only in some samples. This suggests that the ingredients and the manufacturing process have a great effect on what compounds increase their concentration and which do not, during the curation process.
- IV. Comparing curated and uncured samples, it was difficult having to consider an increase of concentration being more important than other just for being greater. It was impossible to take into account the starting point concentration and other aspects, as the compound toxicity or its relationship with specific MOHs' fractions with harmful health effects.  
  
It could be interesting to elaborate a multidisciplinary project that allows relating the markers and the toxicity of the MOAH fraction that they can identify with the concentration of these in curated and uncured adhesives. This could help stablishing the relationship between curation and riskiness on each different adhesive.



## **7. VALORACIÓN PERSONAL**

El desarrollo de este trabajo me ha permitido, a nivel teórico, asentar los conocimientos adquiridos durante el estudio de las asignaturas curriculares de años anteriores del Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Me ha hecho integrar conocimientos de Química General y Analítica con conceptos de higiene y seguridad alimentaria como la migración.

A nivel práctico, he podido mejorar las habilidades en el manejo de un equipo de análisis, en la búsqueda, gestión e interpretación de la información recogida, y he aprendido el funcionamiento de un software especializado para el análisis químico con cromatografía de gases y espectrómetro de masas.

A su vez, a mi parecer, el análisis de los hidrocarburos de aceites minerales en adhesivos es un campo por explorar muy interesante. En el que se puede seguir profundizando el estudio con una muestra más amplia y un número mayor de réplicas, para que esta información pueda ser tenida en cuenta en la elaboración de legislación que regule estos contaminantes.

Por último, quería agradecer a las profesoras Celia Domeño Recalde y Paula Vera Estacho por su muchísima paciencia, atención y todo lo enseñado durante la realización de este trabajo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Food Packaging Forum (2017). *Dossier - Mineral oil hydrocarbons*. Disponible en: [https://www.foodpackagingforum.org/fpf-2016/wp-content/uploads/2017/06/FPF\\_Dossier12\\_mineral-oil-hydrocarbons.pdf](https://www.foodpackagingforum.org/fpf-2016/wp-content/uploads/2017/06/FPF_Dossier12_mineral-oil-hydrocarbons.pdf) [Consultado 13-09-2020]
2. Beens, J. (1998). *Chromatographic couplings for unraveling oil fractions*. Tesis doctoral. Universidad de Amsterdam.
3. Organización Mundial de las Naciones Unidas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (1970) *Toxicological evaluation of some Extraction solvents and certain other substances*. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48aje08.htm> [Consultado 14-11-2020]
4. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (2012). Scientific opinion on mineral oil hydrocarbons in food, EFSA Journal 10(6):2704
5. Vera Estacho, P. (2013). *Estudio de adhesivos en el envase alimentario. Desarrollo de métodos de análisis, difusión y migración de sus componentes a los alimentos envasados*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
6. Unión Europea. Recomendación (EU) 2017/84 de la Comisión de 16 de enero de 2017 sobre la vigilancia de hidrocarburos de aceites minerales en alimentos y en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea, 17 de enero de 2017 (12), 95-96.
7. German Federation of Food Law and Food Science (BLL) (2019). Caja de herramientas para prevenir la transferencia de hidrocarburos de aceites minerales no deseados en los alimentos. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/Guia\\_MOSH\\_MOAH.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/Guia_MOSH_MOAH.pdf) [Consultado 13-09-2020]
8. Comité Europeo de Normalización (2019) *JRC115694: Guidance on sampling, analysis and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials, In the frame of Commission Recommendation (EU) 2017/84*. Disponible en: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC115694> [Consultado 16-11-2020]
9. Jaén, J., Domeño, C., Gajotti, C., y Nerín, C. (2018) *“Selección de posibles marcadores para detectar la presencia de aceites minerales en materiales en contacto con*

- alimentos por GC-MS y APGC-MS-Q-TOF” Jornada de Jóvenes Investigadores del I3A, 6.*  
DOI:10.26754/jji-i3a.201802832
10. Peñalver Hernando, A. M. (2002). *Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental*. Tesis doctoral. Universidad Rovira I Virgili.
  11. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2018) *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros químicos de interés en seguridad alimentaria en España*.  
Disponible en:  
[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/PROSPECTIVOS\\_QUIMICOS.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/PROSPECTIVOS_QUIMICOS.pdf) [Consultado 13-09-2020]
  12. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (2019). *Hidrocarburos de aceites minerales (MOH)*. Disponible en: <http://acsa.gencat.cat/es/detall/article/Hidrocarburos-de-aceites-minerales-MOH-00001> [Consultado 22-09-2020]
  13. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (2017). *Aceites minerales*. Disponible en:  
[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/Aceites\\_minerales.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Aceites_minerales.pdf) [Consultado 13-09-2020]
  14. Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) (2012), *Mineral oils, untreated or mildly treated, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (100) 179-196.
  15. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). *Cromatografía de gases*.  
Disponible en:  
[https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf) [Consultado 28-10-2020]
  16. Coskun, O. (2016). “Separation techniques: Chromatography”. *North Clin Istanbul*, 3(2), pp. 156-160. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206469/#:~:text=Chromatography%20is%20based%20on%20the,aid%20of%20a%20mobile%20phase.> [Consultado 15-11-2020]
  17. Cuadros Rodríguez, L., Gámiz Gracia, L., Carraco Pancorbo, A., Ruiz Samblás, C. (2013). *Glosario de términos analíticos* (1ª edición). Córdoba: Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA).
  18. EN 16955: 2017 “*Foodstuffs – Vegetable oils and foodstuffs on the basis of vegetable oils – Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil*

- aromatic hydrocarbons (MOAH) with online HPLC-GC-FID analysis*". Comité Europeo de Normalización (2017).
19. Ferrer, J. M. (2017). *Control de las contaminaciones por aceites minerales (MOH)*. Disponible en: <https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/legislacion/recomendaciones-ue-para-un-mayor-control-de-las-contaminaciones-por-aceites-minerales-moh-en-alimentos-y-materiales-en-contacto-con-los-alimentos/> [Consultado 13-09-2020]
  20. Georgia State University (2000/2016). *Hyperphysics - Mass Spectrometer*. Disponible en: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/magnetic/maspec.html> [Consultado 14-11-2020]
  21. Gutiérrez, M. C., Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf> [Consultado 15-11-2020]
  22. Lachenmeier, D. W., Mildau, G., Krause, A., Marx, G., Walch, S. G., Hartwig, A., Kuballa T. (2017). "Evaluation of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) in pure mineral hydrocarbon-based cosmetics and cosmetic raw materials using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy". *F1000Research*, 682 (6) DOI: 10.12688/f1000research.11534.1
  23. Ministerio de Salud, Bienestar y Deporte de Países Bajos. Instituto Nacional para la Salud Pública y el Medio Ambiente (2019). *Mineral Oils in food; a review of occurrence and sources*. Disponible en: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2019-0048.pdf> [Consultado 15-11-2020]
  24. Salamero Gil, M. (2017). *Microextracción en fase sólida: Aplicaciones de interés farmacéutico*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Sevilla.

## ANEXO I

Tabla 3: Plan de preparación de patrones y pesos utilizados.

A partir de 100 ppm		
Objetivo	Peso dis. Madre (g)	peso disolu final (g)
10 ppm	0,3054	3,0107
7,5 ppm	0,1921	2,5803
5ppm	0,137	2,778
2,5ppm	0,069	2,769
A partir de 10 ppm		
Objetivo	Peso dis. Madre (g)	peso disolu final (g)
1 ppm	0,3224	3,2268
0,5 ppm	0,1286	2,5919
0,1 ppm	0,0295	2,961
0,75 ppm	0,187	2,4963
A partir de 1 ppm		
Objetivo	Peso dis. Madre (g)	peso disolu final (g)
0,05 ppm	0,133	2,6704
0,01 ppm	0,0308	3,1012
0,005 ppm	0,027	5,7464
A partir de 100 ppb		
Objetivo	Peso dis. Madre (g)	peso disolu final (g)
1ppb	0,0289	2,9029

**Tabla 4: Concentraciones exactas de cada compuesto en patrones 10ppm; 7,5ppm; 5ppm y 2,5ppm.**

Concentración patrones a partir de dis. 100ppm					
Compuestos	100ppm	10ppm	7,5ppm	5ppm	2,5ppm
2-MN	99,1	10,0	7,4	4,9	2,5
1-MN	108,1	11,0	8,0	5,3	2,7
BP	104,1	10,6	7,8	5,1	2,6
2,6-MN	99,4	10,1	7,4	4,9	2,5
ACE	100,9	10,2	7,5	5,0	2,5
9,9-DMF	103,8	10,5	7,7	5,1	2,6
2,6-DIPN	102,5	10,4	7,6	5,1	2,6
3,3,5,5-TMB	102,1	10,4	7,6	5,0	2,5
4-MBT	101,0	10,2	7,5	5,0	2,5
4,6-DMBT	100,5	10,2	7,5	5,0	2,5
3,6-DMP	99,4	10,1	7,4	4,9	2,5
1-MPYR	100,8	10,2	7,5	5,0	2,5
BZNT	103,0	10,4	7,7	5,1	2,6
CHRY	106,7	10,8	7,9	5,3	2,7
BZFLU	100,3	10,2	7,5	4,9	2,5
PER	102,9	10,4	7,7	5,1	2,6

**Tabla 5: Concentraciones exactas de cada compuesto en patrones 1ppm; 0,5ppm; 0,1ppm y 0,75ppm**

Concentración patrones a partir de dis. 10ppm					
Compuestos	10ppm	1ppm	0,5ppm	0,1ppm	0,75ppm
2-MN	10,0	1,0	0,5	0,1	0,75
1-MN	11,0	1,1	0,5	0,1	0,82
BP	10,6	1,1	0,5	0,1	0,79
2,6-MN	10,1	1,0	0,5	0,1	0,76
ACE	10,2	1,0	0,5	0,1	0,77
9,9-DMF	10,5	1,1	0,5	0,1	0,79
2,6-DIPN	10,4	1,0	0,5	0,1	0,78
3,3,5,5-TMB	10,4	1,0	0,5	0,1	0,78
4-MBT	10,2	1,0	0,5	0,1	0,77
4,6-DMBT	10,2	1,0	0,5	0,1	0,76
3,6-DMP	10,1	1,0	0,5	0,1	0,76
1-MPYR	10,2	1,0	0,5	0,1	0,77
BZNT	10,4	1,0	0,5	0,1	0,78
CHRY	10,8	1,1	0,5	0,1	0,81
BZFLU	10,2	1,0	0,5	0,1	0,76
PER	10,4	1,0	0,5	0,1	0,78

**Tabla 6: Concentraciones exactas de cada compuesto en patrones 0,05ppm; 0,01ppm y 0,005ppm.**

Concentración patrones a partir de dis. 1ppm				
Compuestos	1ppm	0,05ppm	0,01ppm	0,005ppm
2-MN	1,0	0,05	0,01	0,005
1-MN	1,1	0,05	0,01	0,005
BP	1,1	0,05	0,01	0,005
2,6-MN	1,0	0,05	0,01	0,005
ACE	1,0	0,05	0,01	0,005
9,9-DMF	1,1	0,05	0,01	0,005
2,6-DIPN	1,0	0,05	0,01	0,005
3,3,5,5-TMB	1,0	0,05	0,01	0,005
4-MBT	1,0	0,05	0,01	0,005
4,6-DMBT	1,0	0,05	0,01	0,005
3,6-DMP	1,0	0,05	0,01	0,005
1-MPYR	1,0	0,05	0,01	0,005
BZNT	1,0	0,05	0,01	0,005
CHRY	1,1	0,05	0,01	0,005
BZFLU	1,0	0,05	0,01	0,005
PER	1,0	0,05	0,01	0,005

**Tabla 7: Concentraciones exactas de cada compuesto en patrón 0,001ppm.**

Concentración patrones a partir de dis. 0,1ppm		
Compuestos	0,1ppm	0,001ppm
2-MN	0,1	0,001
1-MN	0,1	0,001
BP	0,1	0,001
2,6-MN	0,1	0,001
ACE	0,1	0,001
9,9-DMF	0,1	0,001
2,6-DIPN	0,1	0,001
3,3,5,5-TMB	0,1	0,001
4-MBT	0,1	0,001
4,6-DMBT	0,1	0,001
3,6-DMP	0,1	0,001
1-MPYR	0,1	0,001
BZNT	0,1	0,001
CHRY	0,1	0,001
BZFLU	0,1	0,001
PER	0,1	0,001

ANEXO II

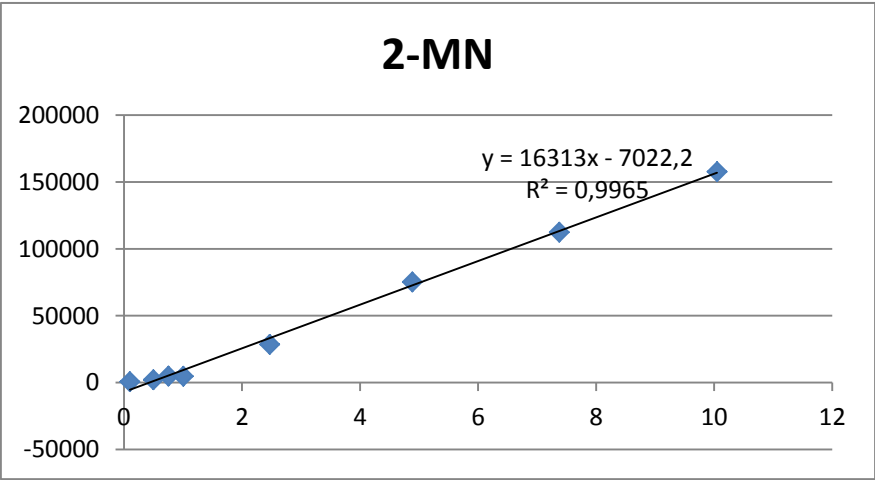


Figura 3: Recta de calibrado del compuesto 2-metilnaftaleno.

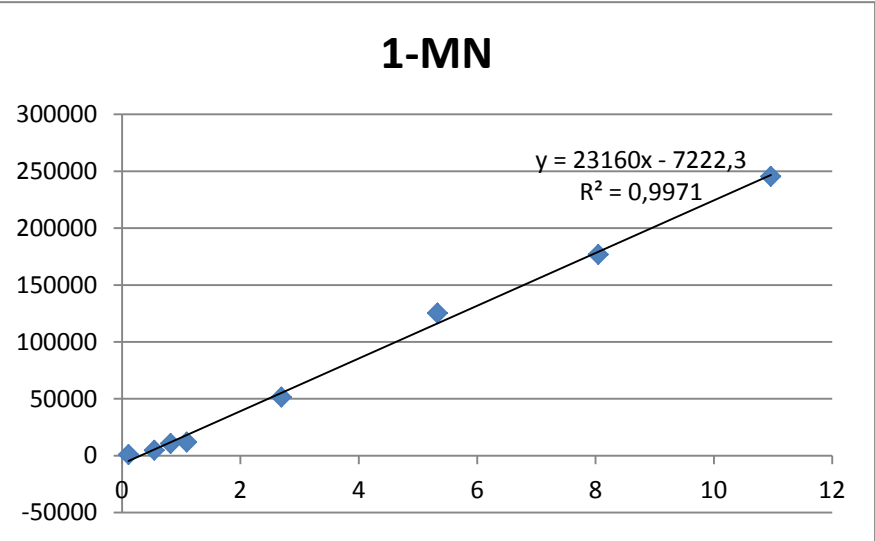


Figura 4: Recta de calibrado del compuesto 1-metilnaftaleno.

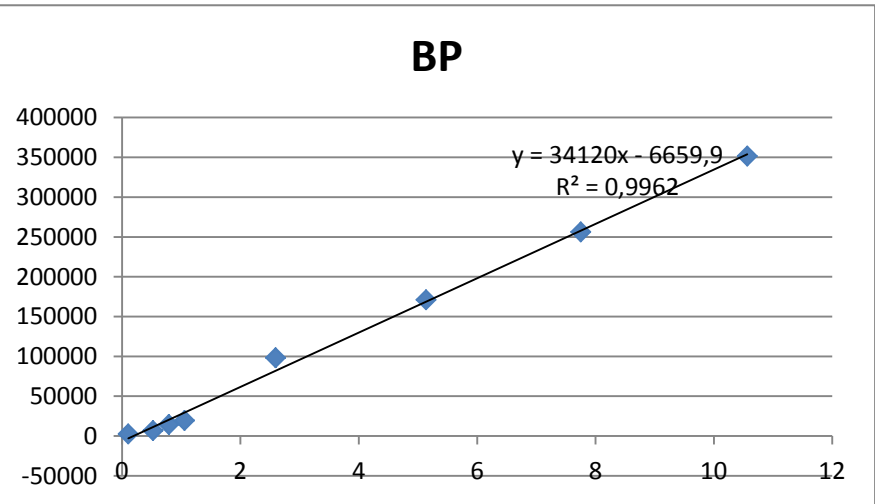


Figura 5: Recta de calibrado del compuesto bifenilo.



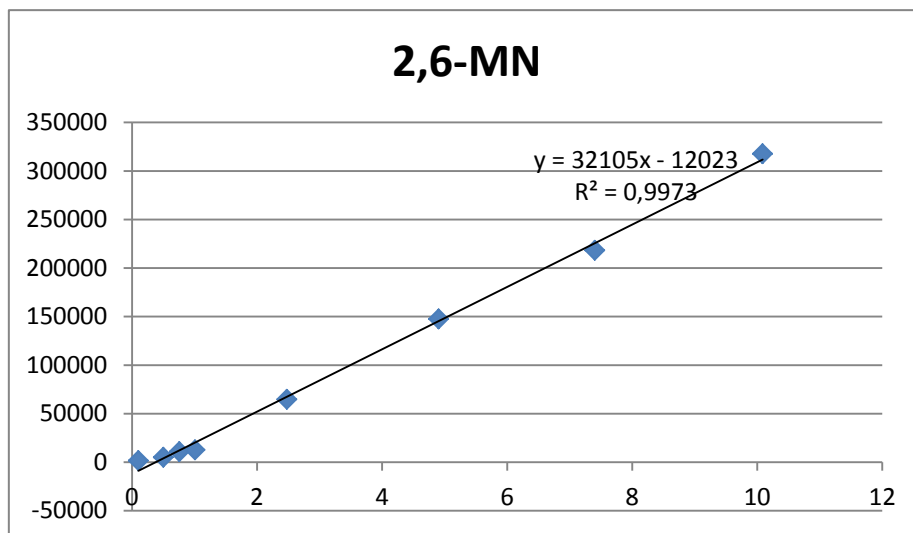


Figura 6: Recta de calibrado del compuesto 2,6-dimetilnaftaleno.

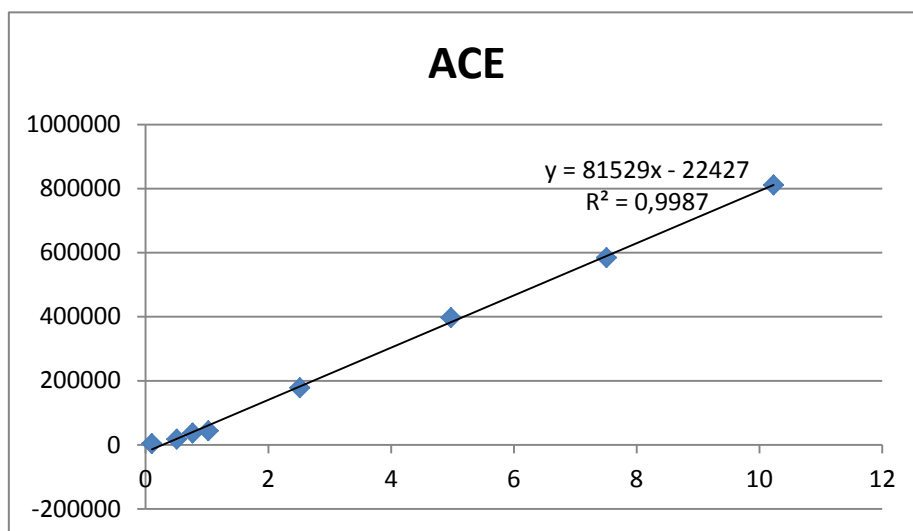


Figura 7: Recta de calibrado del compuesto acenafteño.

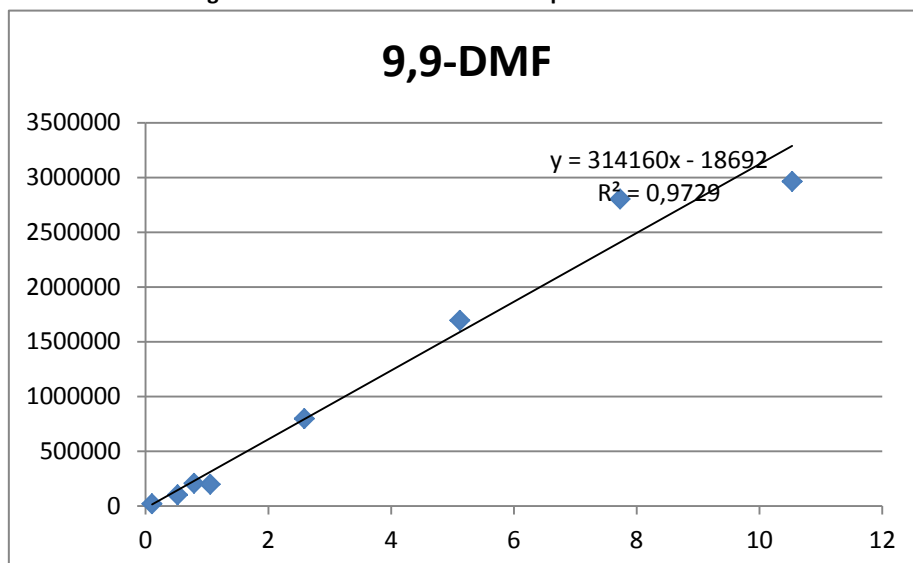


Figura 8: Recta de calibrado del compuesto 9,9-dimetilfluoreno.

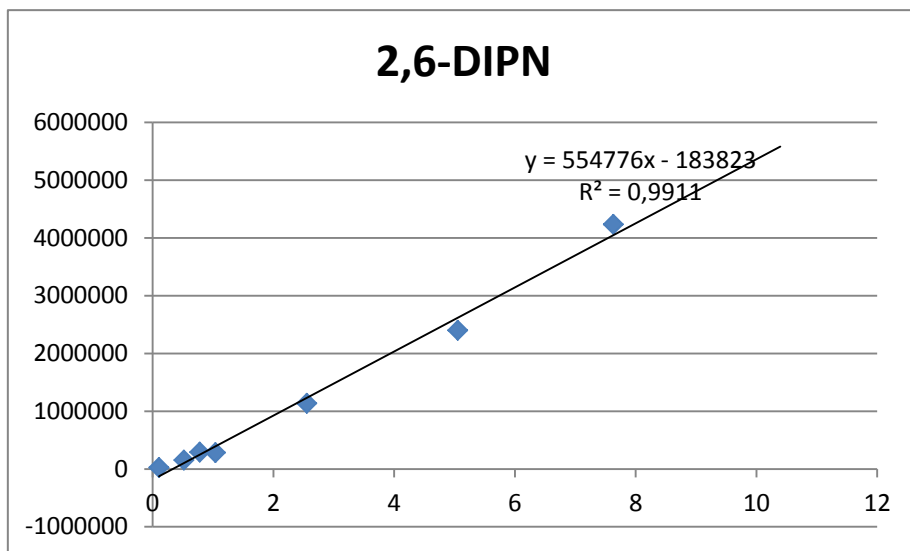


Figura 9: Recta de calibrado del compuesto 2,6-diisopropinaftaleno.

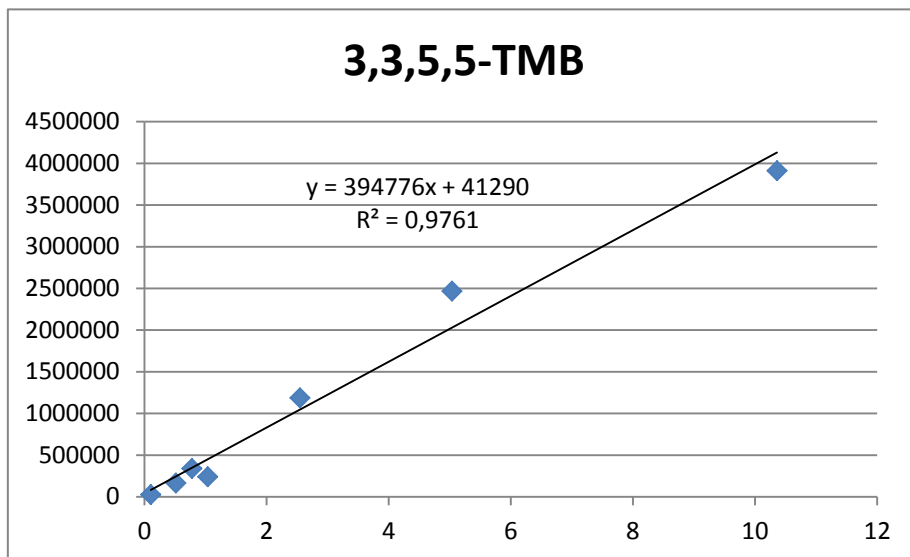


Figura 10: Recta de calibrado del compuesto 3,3',5,5'-tetrametilbifenilo.

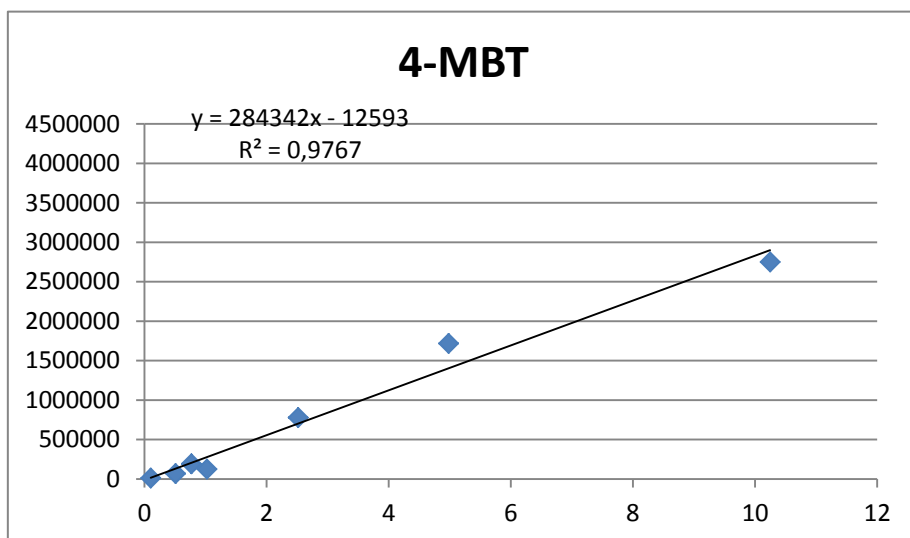


Figura 11: Recta de calibrado del compuesto 4-metildibenzotiofeno.

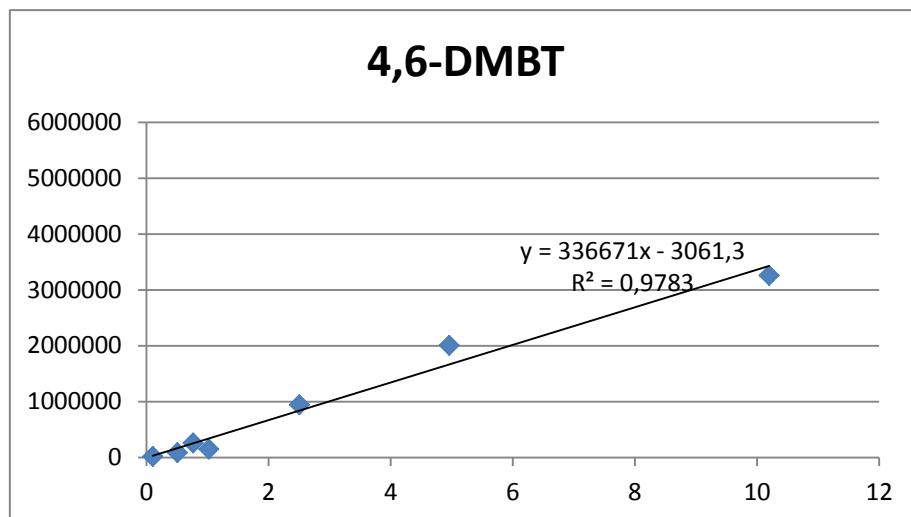


Figura 12: Recta de calibrado del compuesto 4,6-dimetildibenzotiofeno.

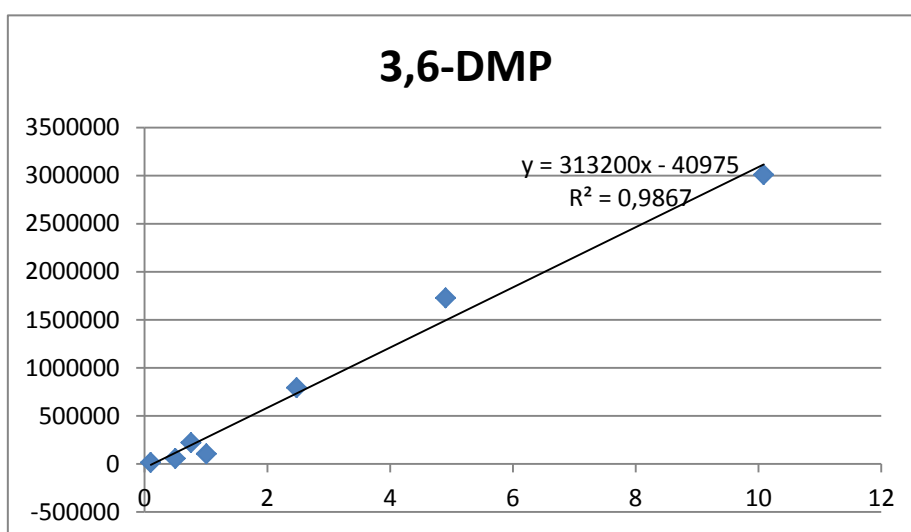


Figura 13: Recta de calibrado del compuesto 3,6-dimetilfenantreno.

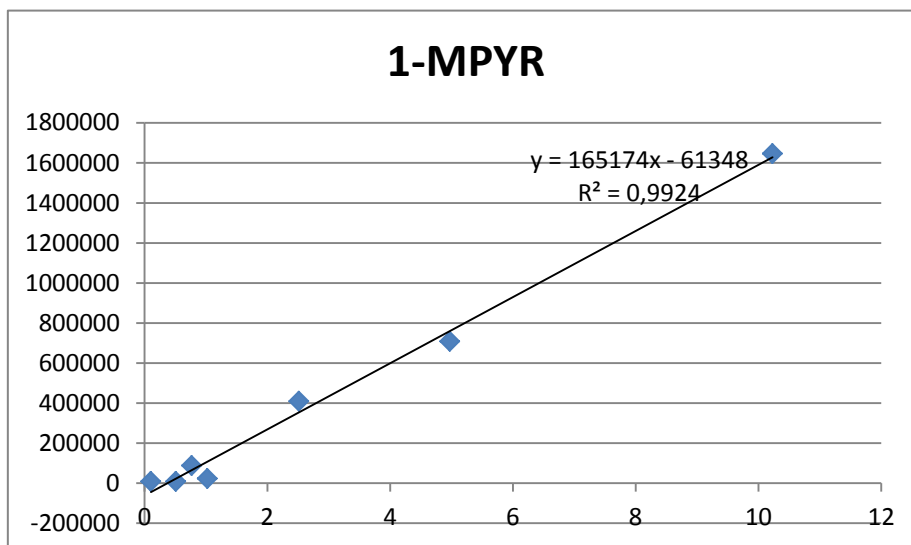


Figura 14: Recta de calibrado del compuesto 1-metilpireno.

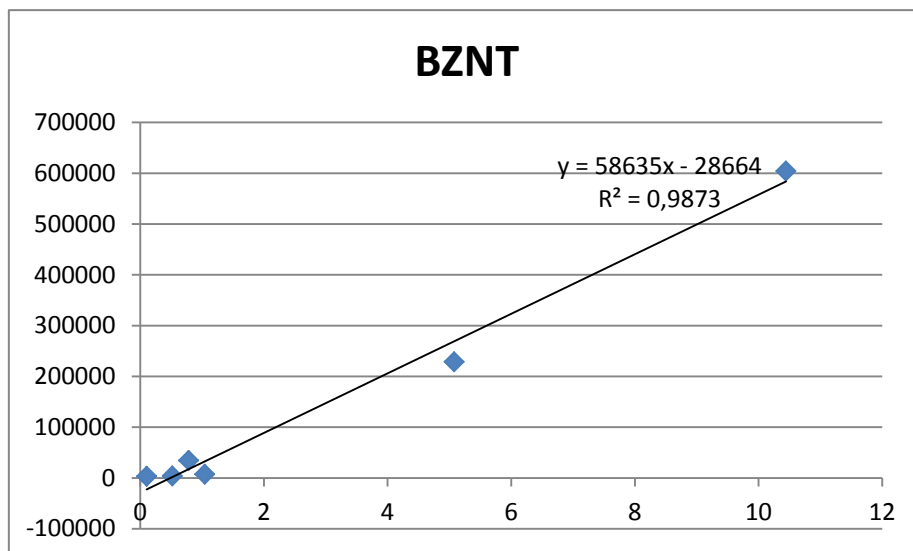


Figura 15: Recta de calibrado del compuesto Benzo(b)napto(2,1-d)tiofeno.

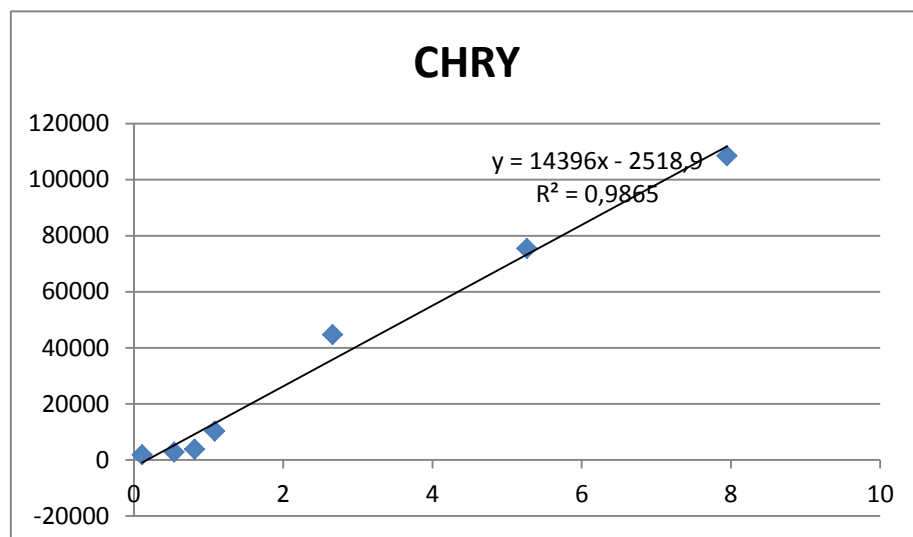


Figura 16: Recta de calibrado del compuesto criseno.